

## 学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 5 2 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	森 弘 樹		
論文題目	JAM4 enhances hepatocyte growth factor-mediated branching and scattering of Madin-Darby canine kidney cells (Madin-Darby canine kidney 細胞において JAM4 は肝細胞増殖因子の誘導する分枝形成と細胞分散を促進する)		

博士(医学) 森 弘 樹

## 論文題目

JAM4 enhances hepatocyte growth factor-mediated branching and scattering of Madin-Darby canine kidney cells (Madin-Darby canine kidney細胞においてJAM4は肝細胞増殖因子の誘導する分枝形成と細胞分散を促進する)

## 論文の内容の要旨

〔はじめに〕

Junctional adhesion molecule 4 (JAM4) はMembrane-associated guanylate kinase with inverted arrangement of protein-protein interaction domain domain 1 (MAGI-1) と相互作用する接着分子として特定され、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する。この分子は腎における発現が強く、糸球体に発現しているほか、近位尿細管、遠位尿細管、集合管の上皮でも密着結合に存在している。さらに近位尿細管では細胞頂部にも存在しており、腎では細胞接着以外の機能も有していると考えた。

ちなみにJAM4同様にイムノグロブリンスーパーファミリーに属するL1という分子は、Rac活性化によるアクチン再構築を促進し、lamellipodiaの形成を促す。このL1は中腎管や後腎にも存在し、腎発生、特に尿管芽の分枝に関与することが示唆されている。

この様に類似した分子の機能から、JAM4に関しても同様の細胞生物学的効果が期待された。

〔材料ならびに方法〕

実験は、まず腎臓に発現しているJAM4が、どの時期からどの部位に発現しているのかを胎生15日、16日、生後0日、3日、7日、成獣のラット腎を用いwestern blot法で調べ、胎生15日のラット腎を免疫組織染色法で調べた。

次にJAM4が分枝形成に関してどのような作用を引き起こすか、Madin-Darby canine kidney (MDCK) でコラーゲンゲル3次元培養を行い、肝細胞増殖因子20ng/mlを加えて分枝形成の実験を行い、野生型との違いを調べた。

分枝形成には細胞移動が必要とされるので、細胞移動について調べるために、FLAG-JAM4を強制発現させたMDCKを使用し、肝細胞増殖因子存在下で細胞分散にも違いが出るかを野生型と比較した。この際、肝細胞増殖因子の濃度を0、1、3、6、10ng/mlとして比較した。

MDCK細胞では、Rac活性の違いがpull down法で明確に確認できなかったため、FLAG-JAM4強制発現により、突起様形態変化の検出が容易なCOS-7の系を用いた。まずその形態変化がJAM4単独によって起こっているのかを、COS-7、FLAG-Junctional adhesion molecule A (JAMA) やFLAG-JAM4を強制発現させたCOS-7細胞で確認した。

Metの下流で活性化される情報伝達経路は、phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)、Akt、Ras、CDC42、Rap1、Racが知られるが、細胞分散に最も関係するのはRacである。そこで、優位抑制型のMyc-RacとコントロールとしてMyc-CDC42やHA-Rap1をFLAG-JAM4と共に強制発現させて、その形態的な違いを、細胞染色を用いて調べた。

実際にRacが活性化しているか調べるために、COS-7とFLAG-JAM4を強制発現したCOS-7細胞にて、GST-PAK-CRIBを用いた活性化Racのpull down実験を行った。この際CDC42のpull down実験も行った。

一方PI3Kの情報伝達経路によるRac活性の抑制効果をみるため、FLAG-JAM4を強制発現したCOS-7に、PI3Kの経路を特異的に抑制する50nMのwortmanninを加え、対FLAG抗体で細胞染色を行った。

#### 〔結果〕

JAM4はラット腎に存在し、胎生15日ですでに発現がみられ、以降上皮と糸球体に発現していた。さらに免疫組織染色で胎生15日では尿管芽上皮に局在し、間葉細胞上皮移行部にも若干発現があると考えられた。

FLAG-JAM4を強制発現させたMDCKでは、親株に比べて、肝細胞増殖因子刺激下での3次元培養において、添加後24時間後の時点で面積あたりの分枝の数が有意に増えた。さらに、48時間後に、親株で面積あたりの分枝数が明らかに減少しているのに対して、FLAG-JAM4を強制発現したものでは、親株ほど減少しなかった。

細胞分散実験では、1ng/mlの肝細胞増殖因子存在下で、FLAG-JAM4の強制発現しているMDCKで細胞分散がみられ始めたが、親株では細胞分散はみられず、3ng/mlの濃度の時点ではじめて細胞分散がみられた。

FLAG-JAM4の強制発現しているCOS-7では、親株やFLAG-JAMAの強制発現しているCOS-7に比べて、明らかに突起様の形態変化が起こっていた。

さらにCOS-7に優位抑制型のMyc-Rac、Myc-CDC42やHA-Rap1をFLAG-JAM4と共に強制発現させると、優位抑制型のMyc-RacとFLAG-JAM4が存在する細胞では突起様の形態変化が抑制された。これは、優位抑制型のMyc-CDC42やHA-Rap1がFLAG-JAM4と共に発現している細胞ではみられなかった。

次にCOS-7を用い、pull down法により活性化Racの量を調べると、FLAG-JAM4を強制発現しているもので、親株に比べ、活性化Racの量が増えていることが確認された。

今回、FLAG-JAM4強制発現下のCOS-7において、PI3K阻害剤であるwortmanninを50nMの条件下で培養し、免疫染色を行い観察したが、突起用の形態変化は抑制されなかった。

#### 〔考察〕

JAM4はRacの調節役に対して、MAGI-1を介してではなく、直接作用してRacの活性を引き起こすと推測された。この理由は、RacやRacの調節役におけるMAGI-1との相互作用がRap1やRhoと違い、確認されないためである。

COS-7を用いた際、形態変化がlamellipodiaではなく、突起様の変化がみられた。この現象の機構は不明であり、Rac下流のlamellipodiaの形成に関わるPAK, WAVE/Scar等の分子機構が、COS-7で働いていない可能性が考えられた。

発生段階の腎においてJAM4は尿管芽由来上皮細胞と後腎由来の上皮細胞に存在している。このとき尿管芽由来の上皮細胞に存在しているJAM4の役割は、肝細胞増殖因子によって誘導されるMet経由の分枝形成への関与から考えて、尿管芽が分枝しながら発達していく発生期の状況を反映するであろう。一方後腎間葉由来の上皮細胞に存在しているJAM4の役割については、今後解析の待たれるところである。

#### 〔結論〕

FLAG-JAM4を強制発現させたMDCKでは、3次元培養に肝細胞増殖因子を加えた際に起こる分枝形成が亢進し、細胞分散実験でも肝細胞増殖因子への分散の反応性が亢進した。

このこととCOS-7の実験系でみられた、FLAG-JAM4強制発現下でのRacの活性上昇を考え合わせると、

これらの生物学的基盤にはJAM4によるRacの活性化があることが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

Junctional adhesion molecule 4 (JAM4) はMembrane-associated guanylate kinase with inverted arrangement of protein-protein interaction domain 1 (MAGI-1) と相互作用する接着因子として特定され、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する。この分子は腎臓における発現が強く、糸球体に発現しているほか、近位尿細管、遠位尿細管、集合管の上皮でも密着結合に存在している。さらに近位尿細管では細胞管腔側にも存在しており、腎臓では細胞接着以外の機能も有していると申請者は考えた。似たようなイムノグロブリンスーパーファミリー分子であるL1は、Rac活性化によるアクチン再構築を促進し、lamellipodiaの形成を促すことがわかっている。L1は中腎管や後腎にも存在し、発生、特に尿管芽の分枝に関与することが示唆されている。

以上の背景のもとに、申請者はJAM4についてもL1と同様な細胞生物学的役割があることを期待して、本研究を行った。ノーザン解析で、JAM4は肝臓、腎臓、胃、小腸、筋肉などに発現しており、特に腎臓には強い発現が認められた。以前の報告で、JAM4はラット糸球体や近位尿細管に発現していることを同じ研究室の同僚が報告していた。そこで、まず大人ラット腎臓より糸球体を濃縮した分画では、皮質全体の分画よりJAM4蛋白質が増加していることを見いだした。また、胎児期15日にはJAM4蛋白質は検出され15日から出生後にかけて増加傾向にあった。そこで、ラット胎生期15日の腎臓切片に蛍光抗体法でJAM4蛋白質の局在を見てみたところ、尿管芽と思われる細胞の管腔側に発現していることを明らかにした。

腎臓尿細管の形成過程にJAM4が関与していることを予測して、尿細管由来MDCK (Maldin Darby canine kidney) 細胞を用いて、生体における尿細管形成のモデルとして、コラーゲンゲル中で3次元培養を試みた。MDCK細胞にJAM4遺伝子を過剰発現させた細胞 (MDCK-JAM4) は特に親株と差異はなかったが、MDCK細胞およびMDCK-JAM4細胞を肝細胞成長因子 (HGF) 存在下で3次元培養すると、MDCK-JAM4細胞は親株に比し、HGFによる細胞分枝を約2.5倍増加させた。次にHGFの細胞分散作用に対する効果を観察すると、MDCK-JAM4細胞はMDCKに比し3倍以上薄い濃度のHGFに対して細胞分散効果が現れた。

次に、HGFのシグナル伝達経路のうち、Racがlamellipodiaの形成や細胞運動性の亢進を介して細胞分散作用に関わっていることが知られている。まずMDCK-JAM4細胞に細胞分散をおこすHGFの最低濃度1ng/mlを処理したところ、予測どおりlamellipodiaが形成された。そこで、MDCK-JAM4細胞において、HGF存在下でRac活性が増加していることを明らかにしようと試みたが、HGF非添加時のRac活性が高すぎるため、HGFによるRacの活性化はMDCK細胞では増加がはっきりとはしなかった。そこで、以前にCOS-7細胞にJAM4を過剰発現させた細胞はたくさんの突起を出すことを見いだしていたので、この突起形成とRac活性との関係を明らかにする実験系で代用しようとした。COS-7細胞にJAM4を過剰発現すると突起形成が起こるが、ファミリーのJAM-Aでは何の変化も起きなかった。このJAM4の過剰発現による突起形成はRacのドミナントネガティブ体を共遺伝子導入すると阻害されるが、CDC42やRap1のドミナントネガティブ体を共遺伝子導入しても阻害されなかったし、PI3K阻害剤であるwortmanninを存在させても阻害されなかった。また、JAM4を過剰発現した細胞抽出液からGST-PAKにて増加した活性型Racが検出できた。以上の事実から、突起形成にはRacの経路が関与していることが示唆された。

本研究はJAM4の未知なる機能を明らかにしようという意欲的なものであり、JAM4が腎臓の組織形成

に重要な役割を果たすことを明らかにしたこと、判定が困難な実験条件が生じても日頃見だしてあった実験系を用いてlamellipodia形成にはRac経路が関与しているという結論を導いた力強さ、を本審査委員会は高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) JAM4はいかにして分離されたか
- 2) JAM4とL1の類似点と相違点について
- 3) MDCK細胞でRac活性が高い理由は
- 4) MDCKの3次元培養で管腔ができていたか
- 5) JAMファミリー分子間の相同的関係は
- 6) JAM4が発現している培養細胞は
- 7) HGF添加時、血清は入っていたか
- 8) 腎糸球体のどこにJAM4が発現しているのか
- 9) MDCK細胞と尿管芽の関係は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	三	浦	直	行	
	副査	浦	野	哲	盟	副査 山 本 清 二